(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2019-0115285
(43) 공개일자 2019년10월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
*A61K 35/64* (2015.01) *A23L 33/10* (2016.01)
*A23L 33/17* (2016.01) *A61P 25/28* (2006.01)
*A61P 3/10* (2006.01)
(52) CPC특허분류
*A61K 35/63* (2015.01)
*A23L 33/10* (2016.08)
(21) 출원번호 10-2018-0038124
(22) 출원일자 2018년04월02일
심사청구일자 2018년04월02일

(71) 출원인
**인천대학교 산학협력단**
인천광역시 연수구 아카데미로 119 (송도동)
(72) 발명자
**이원종**
대전광역시 유성구 엑스포로 448 엑스포아파트
**차연주**
인천광역시 계양구 경명대로1078번길 20, 미도하우스 A동 501호
(74) 대리인
**차준용**

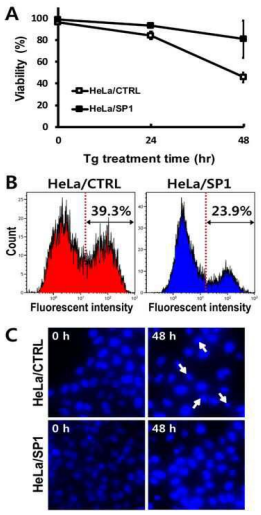
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 **누에의 저장 단백질 1을 유효성분으로 포함하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물**

## (57) 요 약

본 발명은 누에의 저장 단백질 1(SP1)을 포함하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다. 구체적으로, 본 발명의 누에의 저장 단백질 1(SP1)은 세포질 내로 ER $Ca^{2+}$ 방출을 억제하며, CHOP 및 GRP78 발현을 억제함으로써 소포체 스트레스 관련 질환을 예방 및 치료한다.

*대 표 도* - 도1



(52) CPC특허분류
***A23L 33/17*** (2016.08)
***A61P 25/28*** (2018.01)
***A61P 3/10*** (2018.01)
*A23V 2002/00* (2013.01)
*A23V 2200/322* (2013.01)
*A23V 2200/328* (2013.01)

# *명 세 서*

## *청구범위*

### 청구항 1

누에 체액(Silkworm hemolymph)으로부터 분리된 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1)을 유효성분으로 포함하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 저장 단백질 1은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 저장 단백질 1은 CHOP 및 GRP78 의 발현을 억제하여 소포체 스트레스를 감소시키는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 저장 단백질 1은 세포내로 $Ca^{2+}$의 방출을 억제하여 소포체 스트레스를 감소시키는 활성을 갖는 것을 특징으로 하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 소포체 스트레스는 소포체 내에서 단백질의 disulfide 결합 형성이 차단되어 유발되는 것을 특징으로 하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 소포체 스트레스는 소포체에서 골지체로의 단백질 운반이 억제되어 소포체 내에 미접힘 단백질이 축적되어 유발되는 것을 특징으로 하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 소포체 스트레스 관련 질환은 제1형 당뇨, 제2형 당뇨, 알츠하이머 질환 (Alzheimer's disease), 면역글로블린 경쇄 아밀로이드증 (immumoglobulin light chain amyloidosis), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 근위축

성 측삭경화증 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 혈액투석 연관성 아밀로이드증 (haemodialysis-related amyloidosis), 활동성 아밀로이드증 (reactive amyloidosis), 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis), 겸상적혈구 빈혈증 (sickle cell anemia), 헌팅턴병 (Huntington's disease), 크로이츠펠트-야콥 질환 (Kreutzfeldt-Jakob disease), 가족성 고콜레스테롤혈증 (familial hypercholesterolaemia), 알파1-항트립신 결핍증 (Alpha1-antitrypsin deficiency), 경변 (cirrhosis), 전신성 폐기종 (emphysema systemic), 뇌성 유전성 아밀로이드증 (cerebral hereditary amyloidoses), 울콧-랠리스 증후군 (Wolcott-Rallison syndrome), 울프람 증후군 (Wolfram syndrome), 염증성 장질환, 코론씨 병, 궤양성 대장염, 유방암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 조성물.

**청구항 8**

누에 체액(Silkworm hemolymph)으로부터 분리된 저장 단백질 1(Storage Protein 1; SP1)을 유효성분으로 포함하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

**청구항 9**

제8항에 있어서,

상기 저장 단백질 1은 서열번호 1로 표시되는 아미노산 서열을 갖는 것을 특징으로 하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

**청구항 10**

제8항에 있어서,

상기 소포체 스트레스 관련 질환은 제1형 당뇨, 제2형 당뇨, 알츠하이머 질환 (Alzheimer's disease), 면역글로블린 경쇄 아밀로이드증 (immumoglobulin light chain amyloidosis), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 근위축성 측삭경화증 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 혈액투석 연관성 아밀로이드증 (haemodialysis-related amyloidosis), 활동성 아밀로이드증 (reactive amyloidosis), 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis), 겸상적혈구 빈혈증 (sickle cell anemia), 헌팅턴병 (Huntington's disease), 크로이츠펠트-야콥 질환 (Kreutzfeldt-Jakob disease), 가족성 고콜레스테롤혈증 (familial hypercholesterolaemia), 알파1-항트립신 결핍증 (Alpha1-antitrypsin deficiency), 경변 (cirrhosis), 전신성 폐기종 (emphysema systemic), 뇌성 유전성 아밀로이드증 (cerebral hereditary amyloidoses), 울콧-랠리스 증후군 (Wolcott-Rallison syndrome), 울프람 증후군 (Wolfram syndrome), 염증성 장질환, 코론씨 병, 궤양성 대장염, 유방암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것을 특징으로 하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 개선용 건강기능식품 조성물.

## *발명의 설명*

### *기 술 분 야*

[0001] 본 발명은 누에의 저장 단백질 1(SP1)을 포함하는 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료용 약제학적 조성물에 관한 것이다.

### *배 경 기 술*

[0003] 소포체(endoplasmic reticulum-ER)는 매우 역동적이고 복잡한 기관으로, 세포 내에서 다양한 기능들을 한다. 전형적인 진핵 세포(eukaryotic cell)의 경우, 소포체 내강(lumen)에서 대부분의 단백질들의 접힘(folding)과 조립(assembly)이 이루어지고 배출된다. 또한 스테로이드와 지질의 합성이 이루어지는 곳이기도 하다. 그 밖에도 $Ca^{2+}$ 저장과 신호전달에서 주요한 역할을 하기도 하는데, 일반적인 소포체 내부의 $Ca^{2+}$농도는 cytosol 내 $Ca^{2+}$ 농

도보다 높다. 이러한 차이는 소포체 자체에 존재하는 sarco(endo)plasmic reticulum $Ca^{2+}$ ATPase (SERCA) 단백질들로 인한 $Ca^{2+}$의 저장과 Ins(1,4,5)P3, ryanodine receptors로 인한 $Ca^{2+}$의 배출이 가능하기 때문이다. 이런 $Ca^{2+}$의 저장과 배출기능은 소포체로 하여금 기관형성(organogenesis), 전사활성(transcriptional activity), 스트레스 반응(stress response), Apoptosis와 같은 다양한 세포 과정들을 조절할 수 있게 한다. 이러한 다양한 기능 등을 유지하고 있는 소포체에 glucose 고갈, $Ca^{2+}$ 농도의 이상, 단백질의 합성과 분비의 증가 등의 생리학적, 병리학적인 조건들은 소포체 기능에 장애를 발생시키게 되는데, 이를 소포체 스트레스(ER stress)라 한다. 소포체 스트레스로 인해 소포체 기능에 대한 세포학적 요구(cellular demand)와 소포체 수용력간의 불균형이 초래되면서, 세포는 소포체 기능을 보존하기 위한 보상기전으로 UPR (Unfolded Protein Response)이라는 adaptive program을 유발하게 된다.

[0004] 소포체 스트레스(ER stress)란 생리적 혹은 병리적 환경에 의해 소포체가 처리할 수 있는 능력 이상의 미성숙 단백질이 소포체 내로 유입이 되거나 소포체 내 칼슘이 고갈되어 소포체 기능에 장애가 발생하는 것을 말하며, 주로 단백질 접힘 용량을 넘어서서 소포체 단백질 접힘 부하를 초과한 상태를 의미한다. 소포체 스트레스가 발생하면 세포는 생존하기 위한 방어기전을 가지게 되는데, 이를 소포체 스트레스 반응(ER stress response)라고 한다. 소포체 스트레스 반응은 소포체 막에 존재하는 세 가지의 신호전달체계인 PERK(pancreatic ER kinase), IRE-1α/XBP-1(inositol-requiring 1α/X-box binding protein 1) 및 ATF6(activating transcription factor)에 의해 매개된다.

[0005] 소포체 스트레스 반응은 다음의 네 가지 반응 중 하나 이상으로 일어나게 된다. 첫 번째 반응은 리보좀에서 mRNA로부터 단백질로 번역되는 것을 억제(translational attenuation)하여 소포체 내로 새로운 단백질이 유입되는 것을 감소시키는 것이다. 구체적으로, 정상적으로는 개시 메티오닌이 붙어있는 tRNA를 40S 리보솜 소단위체로 수집하는 eIF2(eukaryotic translation initiation factor 2) 중합체의 활성이 감소되는 결과로 단백질 합성이 줄어든다. 또한, 최근에 단백질 접힘 부하를 줄이는 2가지 이상의 메커니즘이 설명되고 있는데, IRE1(ERN1로도 알려짐)-매개 ER-소재 mRNA 분해 메커니즘 (Hollien and Weissman, 2006), 또는 소포체 스트레스를 받은 세포에서는 $p58^{IPK}$(DNAJC3로도 알려짐)에 의해 소포체로 가는 단백질이 합성과 동시에 translocon에서 단백질을 분해를 하는 메커니즘이다. (Oyadomari et al., 2006; Rutkowski et al., 2007)

[0006] 두 번째 반응은 단백질을 접힘 유도하는데 필요한 Bip(HSPA5로도 알려짐)와 같은 소포체 샤페론(chaperon)의 발현을 유도하여 소포체의 접힘 능력을 향상시키는 것이다. 세포질 샤페론이 아닌 소포체 샤페론을 코딩하는 유전자의 전사는 UPR(unfolded protein response)로 알려진 신호전달 경로를 통해 활성화된다. 포유류에서, IRE1, PERK와 ATF6는 소포체 내강에서 잘못 접힌 단백질들의 존재를 감지하는 소포체 막 관통 단백질이다. 정상적인 상태에서 이 신호전달 분자들은 단백질 샤페론인 Bip가 있는 내강 영역의 상호작용을 통해 비활성 상태를 유지한다. Bip는 접힘되지 않은 폴리펩티드 사슬과 상호작용하는 Hsp70 단백질 샤페론 집합체의 소포체 소재 구성원이다. 소포체가 스트레스에 노출되었을 때 Bip는 폴딩되지 않은 단백질에 결합하여 이 스트레스 센서들로부터 분비된다. Bip로부터 IRE1의 분비는 UPR 유전자 발현의 주요 전사 인자를 발생시키는 XBP1의 접합을 개시하기 위해 단백질 키나아제와 엔도리보뉴클라제 활성을 활성화시킨다. Bip로부터 분비되었을 때 PERK가 활성화되고, eIF2의 알파 소단위를 인산화시키고 단백질 합성을 약화시킨다. 역설적으로, eIF2α 인산화는 선택적 mRNA들의 번역과 동시에 촉진된다. 예를 들면, eIF2α 인산화에 의한 전사인자 ATF4의 높은 번역 활성은 UPR 유전자의 약 33% 유도를 야기한다. 마지막으로, Bip 분비는 ATF6를 골지체로 이동시키고 골지체에서 핵으로 이동할 세포질 분절로 분해 Bip와 Grp94(HSP90B1로도 알려짐)와 같은 분자 샤페론과 ER 내재 접힘 효소를 함유하는 UPR 유전자의 전사를 활성화시킨다.

[0007] 세 번째 반응은 소포체 스트레스 관련 분해(ER stress-asoociated degradation, ERAD)로 소포체에서 폴딩되지 않거나 잘못 폴딩된 단백질을 세포질 내 유비퀴틴-프로테아솜(ubiquitin-proteasome) 시스템을 통해 분해하여 제거하는 과정이다.

[0008] 마지막으로 소포체 스트레스가 위의 세 가지 반응으로 극복이 되지 못할 정도로 심각하게 되고 소포체가 제 기능을 회복할 수 없을 때는 세포자연사(apoptosis) 경로가 활성화되어 손상된 세포를 제거한다. 과도하고 지속적인 소포체 스트레스는 소포체 기능을 심각하게 손상시키게 되는데, 이로부터 세포는 몸 전체를 보호하기 위해 세포사멸 과정을 작동하여 손상된 세포를 제거한다. 소포체 스트레스 매개 세포사멸 중 가장 대표적인 것은 C/EBP 가족에 속하는 C/EBP homologous protein(CHOP) 유전자 활성에 의한 세포사멸이다. CHOP/GADD153은 생리적 상태에서는 저농도로 발현되나 소포체 스트레스반응에 의해 활성화 되는 신호전달 단백질들인 PERK, ATF6

및 IRE1에 의해 전사단계에서 강하게 유도된다. CHOP 유전자의 전사조절부위 에는 최소한 4개의 소포체 스트레스 반응성 전사증가 요소 (ER stressresponsive transcriptional enhancer elements-AARE1, AARE2, ERSE1, ERSE2)가 있다. PERK에 의해 번역이 활성화된 ATF4는 AARE1과 AARE2에 결합하고, IRE1에 의해 활성화된 XBP1과 단백질 분해에 의해 활성화된 ATF6는 ERSE와 결합하여 CHOP을 포함한 소포체 스트레스 관련 유전자의 전사를 증가시킨다. 따라서 CHOP은 3가지 소포체 스트레스 관련 신호전달 단백질들 모두에 의해 조절되며, CHOP을 최대한 유도하기 위해서는 3가지 신호전달과정이 모두 필요하다. 연구에 따르면 이런 CHOP 유전자가 결손(CHOP knock out)된 세포는 소포체 스트레스에 의한 세포자연사에 저항적이고, 반대로 CHOP 유전자를 과발현 시키면 세포자연사가 촉진된다고 보고된다. CHOP 이외에도 caspase-12, c-JUN NH2-terminal kinase (JNK)경로를 통해 소포체 스트레스에 의한 세포자연사가 유도되기도 한다.

[0009] 이와 같이 소포체 스트레스 반응은 다양한 세포성 스트레스에서 소포체 기능을 보존하여 세포를 보호하기 위한 중요한 보상 기전이지만, 최근에는 잘못된 신호전달 시스템으로 인하여 과도한 소포체 스트레스 반응이 유발되어 이로 인해 야기되거나 유발되는 질병들이 있다는 것이 알려지고 있다. 즉, 소포체 스트레스 반응은 특히 단백질을 합성하여 분비하는 기능이 활발한 형질세포, 췌장의 베타세포, 간세포, 조골세포와 같은 곳에서 주로 관찰되고 있으며 최근 많은 연구들은 소포체 스트레스가 당뇨병, 파킨슨병, 글루타민 다량체 유발 응집 질환, 헌팅턴 병, 알츠하이머병, 허혈성 질환, 심혈관질환, 고호모시스테인증 및 동맥경화증과 같은 여러 가지 질환의 병인으로 작용함을 보여 주고 있다 (Kudo et al., 2002, Ann. N. Y. Acad. Sci. 977, 349-355; Ozcan et al., 2008,Mol.Cell 29, 541-551; Ozcan et al., 2006, Science 313, 1137-1140; Mattson and Chan, 2003, Cell Calcium 34, 385-397; Conn et al., 2004, Brain Res. 1022, 164-172; Katayama et al., 2004, J. Chem. Neuroanat. 28, 67-78; Pereira et al., 2004, J. Mol. Neurosci. 23, 97-104; Ryu et al.,2005, Neurobiol. Dis. 18, 54-74; Schroder and Kaufman, 2005, Mutat. Res. 569, 29-63.)

[0010] 따라서, 소포체 스트레스를 조절하여 암, 당뇨병, 파킨슨병, 글루타민 다량체 유발 응집 질환, 헌팅턴병, 알츠하이머병, 허혈성 질환, 심혈관질환, 고호모시스테인증 및 동맥경화증과 같은 소포체 스트레스 관련 질환의 발생을 예방하고 치료를 할 수 있을 것으로 제시되고 있으나, 소포체 스트레스반응 기전에 대해서는 알려지지 않은 부분이 많아 이에 대한 연구가 부족한 실정이다. 또한, 효과적으로 소포체 스트레스를 조절할 수 있는 물질을 개발할 필요성이 있다.

## 선행기술문헌

### 비특허문헌

[0012] (비특허문헌 0001) Kudo et al., 2002, Ann. N. Y. Acad. Sci. 977, 349-355

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0013] 본 발명은 ER 스트레스-매개 세포사멸을 억제하고, 세포질 내로 ER $Ca^{2+}$ 방출을 억제하며, CHOP 및 GRP78 발현을 억제하기 위한 누에의 저장 단백질 1을 제공하는 것이다. 또한, 본 발명은 소포체 스트레스 관련 질환의 예방 또는 치료를 위한 약제학적 조성물을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0015] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명자들은 소포체 스트레스 반응의 신호 전달 체계 억제를 위한 조성물을 연구하던 중 누에의 저장 단백질 1(SP1)이 소포체 스트레스에 관여하는 분자들을 억제하여 소포체 스트레스로부터 세포를 보호하는 중요한 기능을 하는 것을 발견하고, 본 발명을 완성하였다.

[0016] 저장 단백질 1(SP1)은 곤충 헤모시아닌 단백질 타입으로서, 누에의 암컷-특이적 단백질이며, 메티오닌이 많은 부분 함유되어 있다.

[0017] 구체적으로, 상기 저장 단백질 1(SP1)은 하기 서열목록에 의해 표시되는 아미노산 서열(서열목록 제2서열의 아미노산 서열)을 갖는 것일 수 있다. 이 중 본 발명에서 사용된 SP1은 16번인 Thr부터 해당된다.

[0018] 상기 SP1을 누에 체액으로부터 분리, 정제하는 방법은 특별히 제한되지 않으며, 예를 들어 한국등록특허 제10-0530506호, 또는 본 발명자의 선행 연구인 「Kim, E. J., W. J. Rhee, and T. H. Park (2001) Isolation and Characterization of an Apoptosis-Inhibiting Component from the Hemolymph of *Bombyx mori*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 285: 224-228.」 및 「Rhee, W. J., E. H. Lee, J. H. Park, J. E. Lee, and T. H. Park (2007) Inhibition of HeLa cell apoptosis by storage-protein 2. *Biotechnol. Prog.* 23: 1441-1446.」를 참조하여 SP1을 수득할 수 있다.

[0019] 본 발명의 SP1 발현 안정 세포주 제조에 사용되는 상기 저장 단백질 1(SP1) 유전자는 유전자 등록번호(GenBank accession number) NM_001113276인 것일 수 있다.

[0021] 본 발명은 소포체 스트레스 관련 질환 예방 및 치료제로써, 누에의 저장 단백질 1이 ER 스트레스-매개 세포사멸을 억제하고, 세포질 내로 ER $Ca^{2+}$ 방출을 억제하며, CHOP 및 GRP78 발현을 억제시키는 효과를 이용하여 소포체 스트레스 반응을 억제하고 소포체 스트레스 관련 질환을 예방 또는 치료하는 것이다.

[0022] 소포체 스트레스가 주어지면 PERK, IRE-1α/XBP-1 및 ATF6의 세가지 경로로 소포체 스트레스에 대한 센서 분자들이 이를 인식하여 스트레스에 대한 반응으로 각각 경로에 따라서, CHOP, Grp78, ERdj4, XBP-1 등의 유전자 발현이 크게 증가하게 된다.

[0023] 실험실에서 널리 이용되고 있는 소포체 스트레스 유도물질은 thapsigargin, tunicamycin, dithiothreitol(DTT), brefeldin A 등을 들 수 있다

[0024] 탑시가르긴(Thapsigargin, Tg)은 SERCA 단백질의 선택적인 억제제로 작용함으로써 소포체 스트레스를 유도한다. SERCA는 소포체의 cytosol에서 내강으로 $Ca^{2+}$을 전달하는 포유류 세포에 존재하는 Pump로, 탑시가르긴이 그 역할을 억제함으로써 소포체내 $Ca^{2+}$의 방출을 유도시키게 되고 인위적인 소포체 스트레스를 유발하게 된다.

[0025] DTT(dithiothreitol)는 소포체 내의 disulfide 결합을 제거하여 소포체내 단백질들의 접힘을 방해함으로써 소포체 스트레스를 유발시킨다.

[0026] brefeldin A는 소포체에서 골지체로의 단백질 운반을 억제함으로써 소포체에서 미접힘 단백질의 축적을 유도한다.

[0028] 본원에서 사용되는 용어, "소포체 스트레스(ER stress)"란 생리적 혹은 병리적 환경에 의해 소포체가 처리할 수 있는 능력 이상의 미성숙 단백질이 소포체 내로 유입이 되거나 소포체 내 칼슘이 고갈되어 소포체 기능에 장애가 발생하는 것을 말한다.

[0029] 또한, "소포체 스트레스 관련 질환" 이란 소포체 스트레스로 인해 발생하거나 악화되는 질환을 말하며, 예컨대 세포 내에 단백질의 과도한 축적으로 인해 분해시스템이 더 이상 작동하기 어려워지면서 그 자체가 세포에 독성을 보여 야기되는 질환(신경 퇴행성 질환 등), 또는 잘못된 신호 전달 시스템으로 인하여 과도한 소포체 스트레스 반응이 유발되어 이로 인해 야기되거나 유발되는 질병(당뇨병 등)이 이에 포함 될 수 있다.

[0030] 구체적으로 소포체 스트레스 관련 질환은 제1형 당뇨, 제2형 당뇨, 알츠하이머 질환 (Alzheimer's disease), 면역글로블린 경쇄 아밀로이드증 (immumoglobulin light chain amyloidosis), 파킨슨병 (Parkinson's disease), 근위축성 측삭경화증 (amyotrophic lateral sclerosis, ALS), 혈액투석 연관성 아밀로이드증 (haemodialysis-related amyloidosis), 활동성 아밀로이드증 (reactive amyloidosis), 낭포성 섬유증 (cystic fibrosis), 겸상적혈구 빈혈증 (sickle cell anemia), 헌팅턴병 (Huntington's disease), 크로이츠펠트-야콥 질환 (Kreutzfeldt-Jakob disease), 가족성 고콜레스테롤혈증 (familial hypercholesterolaemia), 알파1-항트립신 결핍증 (Alpha1-antitrypsin deficiency), 경변 (cirrhosis), 전신성 폐기종 (emphysema systemic), 뇌성 유전성 아밀로이드증 (cerebral hereditary amyloidoses), 울콧-랠리스 증후군 (WolcottRallison syndrome), 울프람 증후군 (Wolfram syndrome), 염증성 장질환, 코론씨 병, 궤양성 대장염, 유방암 및 전립선암으로 이루어진 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0031]

[0032] 본 발명의 조성물은 경구 또는 비경구의 여러 가지 제형일 수 있다. 상기 조성물을 제형화할 경우에는 하나 이상의 완충제(예를 들어, 식염수 또는 PBS), 항산화제, 정균제, 킬레이트화제(예를 들어, EDTA 또는 글루타치온), 충진제, 증량제, 결합제, 아쥬반트(예를 들어, 알루미늄 하이드록사이드), 현탁제, 농후제, 습윤제, 붕해제 또는 계면활성제, 희석제 또는 부형제를 사용하여 조제될 수 있다.

[0033] 비경구 투여시 피부 외용 또는 복강내주사, 직장내주사, 피하주사, 정맥주사, 근육내 주사 또는 흉부내 주사 주입방식을 선택하는 것이 바람직하다. 본 발명의 조성물의 치료적으로 유효한 양은 여러 요소, 예를 들면 투여방법, 목적부위, 환자의 상태 등에 따라 달라질 수 있다. 따라서, 인체에 사용 시 투여량은 안전성 및 효율성을 함께 고려하여 적정량으로 결정되어야 한다. 동물실험을 통해 결정한 유효량으로부터 인간에 사용되는 양을 추정하는 것도 가능하다. 유효한 양의 결정시 고려할 이러한 사항은 문헌에 기재된 내용을 참고할 수 있다(Hardman and Limbird, eds., Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed.(2001), Pergamon Press; 및 E.W. Martined., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th ed.(1990), Mack Publishing Co.).

[0034] 본 발명의 조성물은 또한 생물학적 제제에 통상적으로 사용되는 담체, 희석제, 부형제 또는 둘 이상의 이들의 조합을 포함할 수 있다. 약제학적으로 허용 가능한 담체는 조성물을 생체 내 전달에 적합한 것이면 특별히 제한되지 않으며, 예를 들면, 머크 인덱스(Merck Index, 13th ed., Merck & Co. Inc.)에 기재된 화합물, 식염수, 멸균수, 링거액, 완충 식염수, 덱스트로스 용액, 말토 덱스트린 용액, 글리세롤, 에탄올 및 이들 성분 중 1 성분 이상을 혼합하여 이용할 수 있으며, 필요에 따라 항산화제, 완충액, 정균제 등 다른 통상의 첨가제를 첨가할 수 있다. 또한, 희석제, 분산제, 계면활성제, 결합제 및 윤활제를 부가적으로 첨가하여 수용액, 현탁액, 유탁액 등과 같은 주이용 제형, 환약, 캡슐, 과립 또는 정제로 제제화할 수 있다. 나아가, 당 분야의 적정한 방법으로 문헌(예를 들면, Remington's Pharmaceutical Science(Mack Publishing Company, Easton PA, 18th, 1990)에 개시되어 있는 방법을 이용하여 각 질환에 따라 또는 성분에 따라 바람직하게 제제화할 수 있다.

[0035] 본 발명의 조성물은 소포체 스트레스 질환의 예방 및 치료를 위하여 단독으로, 또는 수술, 방사선 치료, 호르몬 치료, 화학 치료 및 생물학적 반응 조절제를 사용하는 방법들과 병용하여 사용할 수 있다.

[0036] 상기 건강기능(성) 식품(functional food)이란, 특정보건용 식품(food for special health use, FoSHU)와 동일한 용어로, 영양 공급 외에도 생체조절기능이 효율적으로 나타나도록 가공된 의학, 의료효과가 높은 식품을 의미한다.

[0037] 여기서 "기능(성)"이라 함은 인체의 구조 및 기능에 대하여 영양소를 조절하거나 생리학적 작용 등과 같은 보건용도에 유용한 효과를 얻는 것을 의미한다. 본 발명의 식품은 당 업계에서 통상적으로 사용되는 방법에 의하여 제조가능하며, 상기 제조시에는 당 업계에서 통상적으로 첨가하는 원료 및 성분을 첨가하여 제조할 수 있다. 또한 상기 식품의 제형 또한 식품으로 인정되는 제형이면 제한 없이 제조될 수 있다. 본 발명의 식품용 조성물은 다양한 형태의 제형으로 제조될 수 있으며, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용 등이 없는 장점이 있고, 휴대성이 뛰어나, 본 발명의 식품은 소포체 스트레스 억제 효과를 증진시키기 위한 보조제로 섭취가 가능하다.

[0038] 구체적으로, 상기 건강 기능 식품은 누에 저장 단백질 1을 음료, 차류, 향신료, 껌, 과자류 등의 식품소재에 첨가하거나, 캡슐화, 분말화, 현탁액 등으로 제조한 식품으로, 이를 섭취할 경우 건강상 특정한 효과를 가져오는 것을 의미하나, 일반 약품과는 달리 식품을 원료로 하여 약품의 장기 복용 시 발생할 수 있는 부작용이 없는 장점이 있다.

## *발명의 효과*

[0040] 본 발명의 누에의 저장 단백질 1(SP1)은 소포체 스트레스와 관련된 여러 가지 단백질 발현에 관여하며, 또한 세포사멸(apoptosis)과 관련된 세포사멸 전구단백질 (pro-apoptotic protein) 및 항-세포사멸 단백질 (anti-apoptotic protein)의 발현에 영향을 주어 소포체 스트레스를 완화시키는 효과가 있다. 구체적으로, 본 발명의 누에의 저장 단백질 1(SP1)은 세포질 내로 ER $Ca^{2+}$ 방출을 억제하며, CHOP 및 GRP78 발현을 억제함으로써 소포체 스트레스 관련 질환을 예방 및 치료한다.

## 도면의 간단한 설명

[0042] 도 1은 소포체 스트레스 유발 세포사멸에 미치는 SP1의 영향을 나타내는 도면이다. SP1(HeLa/CTRL)을 발현하지 않는 HeLa 세포주 및 SP1(HeLa/SP1)을 안정적으로 발현하는 HeLa 세포주가 다양한 시간 동안 10 μM Tg가 있거나 혹은 없는 상태에서 처리되었다.

(A) 세포 생존력이 Tg 처리 후 0, 24 및 48시간에 측정되었다(모든 값 = 평균값 ± 표준 편차, n = 3).

(B) HeLa/CTRL(왼쪽)과 HeLa/SP1(오른쪽) 세포는 Tg 처리 후 0시간과 80시간에 propidium iodide(PI)로 염색되었다. 점선으로 표시된 것보다 높은 형광 강도를 갖는 세포는 사멸 세포로 계산하였다.

(C) 세포를 Tg로 48시간 동안 처리하고 핵분열의 관찰을 위해 Hoechst 33342 염색으로 항-세포사멸 효과를 분석하였다. 화살표는 조각 세포사멸 핵을 나타낸다.

도 2는 소포체 스트레스에 의해 유도된 미토콘드리아 막전위의 붕괴에 대한 SP1의 효과를 나타내는 도면이다. 세포를 배양하고 Tg로 0시간 및 8시간 동안 처리한 후, 미토콘드리아 막전위를 형광 측정기로 측정하였다(모든 값 = 평균값 ± SD, n = 3, * p <0.05). SP1을 발현하는 세포는 SP1 발현이 없는 세포보다 더 높은 미토콘드리아 막전위를 나타냈다.

도 3은 Tg 처리 후 HeLa/CTRL 및 HeLa/SP1 세포에서 qPCR (A, C) 또는 웨스턴 블랏(B, D)에 의해 분석된, 소포체 스트레스에 의해 영향을 받는 유전자의 세포질 mRNA 및 단백질 수준을 나타내는 도면이다.

(A, C) 표시된 시간 간격으로 각 세포주에서 액틴 mRNA 수준에 의해 CHOP (왼쪽)와 GRP78 (오른쪽) mRNA 수준이 측정되고 표준화되었다(모든 값 = 평균 ± SD, n = 3, * p <0.05). 소포체 스트레스 동안 CHOP 및 GRP78 수준 모두가 크게 증가했지만 SP1 발현은 이들 유전자의 발현 증가를 유의하게 완화시켰다.

(B, D) 각 세포주에서 CHOP (왼쪽)와 GRP78 (오른쪽) 단백질 수준을 분석했다. GAPDH는 대조군으로 사용되었다.

도 4는 Tg 처리 전후의 세포질 칼슘($Ca^{2+}$) 수준을 나타내는 도면이다. Tg로 0시간 및 1시간 동안 처리한 세포는 Fluo-3, AM 염료로 세포질 $Ca^{2+}$ 수준을 분석하였다. 세포액에서 증가된 $Ca^{2+}$ 수준은 감소된 소포체 $Ca^{2+}$ 수준을 나타낸다. HeLa/CTRL 세포에서 소포체 스트레스 유도 후 세포질 $Ca^{2+}$ 수준이 유의하게 증가 하였지만, HeLa/SP1 세포에서는 세포질 $Ca^{2+}$ 수준이 증가하지 않았다(모든 값=평균 ± SD, n = 4, *** p <0.001이었음).

도 5 다른 유형의 소포체 스트레스 유도제에 의해 유도된 세포사멸에 대한 SP1의 효과를 나타내는 도면이다. SP1(HeLa/CTRL)을 발현하지 않는 HeLa 세포주 및 SP1(HeLa/SP1)을 안정적으로 발현하는 HeLa 세포주를 (A) 2 mM DTT 또는 (B) 2 μM Brefeldin A로 처리하였다. 세포 생존율은 처리 후 0시간과 36시간에 트라이판 블루 배제분석(모든 값 = 평균값 ± SD, n = 3, * p <0.05, *** p <0.001)을 사용하여 측정되었다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0043] 이하, 실시예 및 실험예를 통해 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다. 그러나 이들 예는 본 발명의 이해를 돕기 위한 것일 뿐 어떠한 의미로든 본 발명의 범위가 이들 예로 한정되는 것은 아니다.

[0044] **실시예**

[0045] **(1) 세포 배양 및 탑시가르긴 처리**

[0046] SP1(HeLa/SP1)을 발현하는 재조합 HeLa 세포와 SP1 미발현 대조군 세포 (HeLa/CTRL)는 이전 보고서(Lee, J. H., T. H. Park and W. J. Rhee (2015) Inhibition of apoptosis in HeLa cell by silkworm storage protein 1, SP1. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 20: 807-813.)에 기술된 방법에 기초하여 구축되었다.

[0047] SP1 유전자(GenBank, NM_001113276)를 PCR에 의해 증폭시키고 pEGFP-N1 플라스미드에 클로닝 하였다. 이 때, 사용한 프라이의 서열은 다음과 같다.

[0048] Fw.: 5'- GAA TTC ATG ACA GCG ATT AGT GGT GGC -3'

[0049] Rv.: 5'- GAG CAG CAT GAT GAA CTG ACT CGA G -3

[0050] 모든 세포주가 다른 SP1 발현 수준으로 인해 아마도 같은 수준의 항-세포 사멸 효과를 갖는 것은 아니기 때문에, 항-세포 사멸 저항성을 가장 많이 갖는 세포주가 최종 세포주로 선택되었다. 10% 소태아혈청(FBS)과 1% 페니실린/스트렙토마이신(Life Technologies, USA)을 함유한 Dulbecco 's Modified Eagle's medium(DMEM) (Biowest, France)에서 세포를 배양하고, 가습 조직 배양기에서 37℃ 및 5% $CO_2$로 유지하였다. 탑시가르긴(Tg) (Sigma, USA)을 디메틸술폭시드(DMSO) (Duchefa, Netherlands)에 용해시키고 각각의 실험에 대해 상이한 농도로 사용하였다.

[0052] **(2) 트리판 블루 염색, 유동세포 계측법 및 형광 현미경에 의한 세포 사멸 분석**

[0053] 세포를 $3x10^4$세포/$cm^2$의 밀도로 24-웰 플레이트 상에 접종하고 10mM의 Tg를 처리 하였다. hemocytometer를 이용한 trypan blue 염색 배제 방법으로 죽은 세포와 살아있는 세포를 계수 하였다. 유세포 분석을 위해 세포를 10 μg/ml propidium iodide(PI) 로 염색하고 형광 레벨을 유동세포 계측기(Beckman Coulter, Inc.)로 분석 하였다. 세포 사멸의 주요 특징인 핵 응축과 분열을 검사하기 위해 세포를 Hoechst 33342 형광 염료 2 μg/mL로 염색한 후 형광 현미경으로 가시화했다.

[0055] **(3) 미토콘드리아 막전위 측정**

[0056] 미토콘드리아 기능을 확인하기 위해 세포를 3 μM의 Tg로 8시간 처리한 후 준비된 Mito-ID® MP 염료 용액(Mito-ID® Membrane Potential Cytotoxicity Kit, Enzo, USA)을 100 μL/37℃에서 30분간 배양 하였다. Fluorescence는 Varioskan™ Flash Multimode Reader(Thermo Scientific, USA)를 사용하여 490 nm의 여기(excitation)와 580 nm의 방출(emission)로 측정되었다.

[0058] **(4) 실시간 중합효소연쇄반응(quantitative real-time PCR) 분석**

[0059] 세포의 총 RNA를 Trizol시약(Taiwan, Favourgen)으로 분리하고 cDNA의 첫 번째 가닥을 ReverTra Ace qPCR RT 마스터 믹스 (TOYOBO, Japan)로 합성했다.

[0060] 이 연구에서 프라이머는 Cosmogenetech (한국)에 의해 합성되었고 서열은 다음과 같다 : 5'-ACT GTT ACA ATC AAG GAT ATA GAG G-3 '(정방향 프라이머) 및 5'-CAA AGG TGA CTT CAA TCT GTG G- (역방향 프라이머) 및 5'-GGG AGC CAA (역방향 프라이머), 5'-AAG GAA AGT GGC ACA GCT-3 '(정방향 프라이머) 및 5'-CTG GTC AGG CGC TCG ATT- GAPDH에 대한 AAG GGT CAT-3 '(정방향 프라이머) 및 5'-GAG GGG CCA TCC ACA GTC-3'(역방향 프라이머). 모든 qPCR은 SYBR Green PCR kit (Qiagen, Germany)를 사용하여 Step One Plus 실시간 PCR 시스템 (Applied Biosystem, USA)에서 수행하였고, 상대 mRNA 수준은 $2^{-ddCt}$ 방법을 사용하여 계산하였다.

[0062] **(5) 웨스턴 블럿(Western blotting)**

[0063] 세포는 protease inhibitor (Thermo Scientific, USA)와 함께 RIPA buffer (Elpis biotech, Korea)를 사용하여 용해시켰다. 추출 후, 각 샘플의 20 ㎍ 단백질을 폴리 아크릴아미드 SDS 겔로 분리하고 PVDF 멤브레인(Bio rad, USA) 상으로 옮겼다. 그런 다음 막을 5 % 탈지분유가 함유된 0.1 % tween 20 (TBS-T)가 함유된 Tris 완충 식염수에서 2시간 동안 블로킹하고 단일 클론 마우스 anti-CHOP 항체 (Cell Signaling Technology, USA), 단일 클론 토끼 anti-BiP (Cell Signaling Technology, USA)와 monoclonal rabbit anti-GAPDH 항체 (Cell Signaling Technology, USA)를 사용하여 4 ℃에서 하룻밤 동안 배양 하였다. TBS-T를 사용하여 막을 세척하고 항 마우스 IgG, HRP-결합 항체 (Abcam, USA) 또는 항-토끼 IgG, HRP-결합 항체 (Cell Signaling Technology, USA)와 함께 실온에서 1시간 동안 배양 하였다. 마지막으로 ECL 시약 (GE healthcare, UK)을 사용하여 단백질 밴드를 시각화 했다.

[0065] **(6) 세포내 자유 $Ca^{2+}$ 의 측정**

[0066] Tg는 세포의 $Ca^{2+}$ 항상성을 파괴하기 때문에 Tg-처리 세포의 세포질에서 유리 $Ca^{2+}$ 농도를 검사하였다. 10 μM의 Tg로 1시간 처리한 HeLa 세포를 37℃ 30분간 5M의 $Ca^{2+}$ 감광 염료 Fluo-3, AM (Invitrogen, USA)으로 염색하였다. 세척 후, 세포를 탈에스테르화를 위해 실온에서 30분 동안 $Ca^{2+}$없는 Dulbecco's PBS (Biowest, France)와 함께 배양 하였다. 형광은 Varioskan™ Flash Multimode Reader를 사용하여 506 nm에서 여기하고 526 nm에서 방출하여 측정했다.

[0068] **실험예**

[0069] **(1) SP1의 소포체 스트레스 유발 세포사멸 억제**

[0070] 소포체 (endoplasmic reticulum: ER) 스트레스에 세포가 장기간 노출되면 세포사멸이 일어나는 것으로 알려져 있다. SP1이 소포체 스트레스에 의한 세포사멸을 억제할 수 있는지 조사하기 위해 안정적으로 SP1 (HeLa/SP1)을 발현하는 세포주를 제작하여 실험에 사용하였다. Thapsigargin (탑시가르긴: Tg) 처리 전과 후에 trypan blue exclusion assay (트라이판 블루 배제 분석)를 사용하여 세포 생존력을 측정하였다.

[0071] Tg는 소포체에서 $Ca^{2+}$ 항상성을 파괴함으로써 UPR(Unfolded Protein Response: 미접힘 단백질 반응)을 활성화시킨다. 도 1A에 보이는 바와 같이, 10 μM의 Tg로 처리하면 처리 후 24시간에 HeLa/CTRL의 생존율이 84.3%까지 현저하게 감소했으며, 이는 처리 후 48시간에 45.6% 까지 더 감소했다. 반대로, HeLa/SP1에서의 Tg 처리 후 세포 생존률은 처리 후 24시간 및 48시간에서 각각 93.4까지 및 80.8% 까지만 감소하였다. 이 결과는 SP1이 소포체 스트레스 유발성 세포사멸을 억제할 수 있음을 나타낸다.

[0072] 소포체 스트레스 유발 세포사멸 억제에 대한 SP1의 효과의 추가 평가는 흐름세포측정(flow cytometry)을 사용하여 수행되었다(도 1B). 세포를 Tg로 80시간 처리하고 PI로 염색하여 흐름세포측정을 통해 분석한 결과, HeLa/CTRL 세포의 39.3%가 죽은 것으로 나타났으나 HeLa/SP1 세포의 경우에는 23.9%만이 죽었다. 이것은 HeLa/SP1이 소포체 스트레스에 의해 유발된 세포사멸에 대한 향상된 내성을 보였다는 것을 나타낸다.

[0073] 핵분열이 세포사멸 과정의 중요한 특징이기 때문에 형광 현미경을 통해 Tg 처리된 HeLa/CTRL 및 HeLa/SP1 세포주에서 핵 분열의 징후를 확인했다. 48시간의 Tg 처리 후에 많은 HeLa/CTRL 세포가 작은 조각핵으로 보였지만 소수의 HeLa/SP1 세포만이 조각핵으로 보였다(도 1C). 전반적으로, 이러한 결과는 SP1이 소포체 스트레스에 의해 유발된 세포사멸을 억제할 수 있음을 명확히 나타낸다.

[0075] **(2) 미토콘드리아 막전위의 Tg-유도 붕괴에 대한 SP1의 효과**

[0076] 미토콘드리아 막전위 붕괴는 핵분열의 상류에서 일어나는 세포사멸 사건이다. SP1이 핵분열을 억제했다는 것을 일단 확인하고, 본 발명자는 소포체 스트레스에 의해 유발된 세포사멸 중 핵분열의 상류에 있는 미토콘드리아 막전위 붕괴에 대한 SP1의 효과를 조사했다.

[0077] HeLa/CTRL 및 HeLa/SP1 세포의 미토콘드리아 막전위을 Tg로 0시간 또는 8시간 동안 처리하고 Mito-ID® 염료로 염색한 다음 형광 분석기(fluorometer)로 분석하였다(도 2). SP1이 없는 경우, 미토콘드리아 막전위는 처리되지 않은 세포에 비해 Tg 처리 8시간 후 48.0%로 감소했다. 대조적으로, 미토콘드리아 막전위 수준은 SP1을 발현하지 않는 세포주에서 보다 SP1을 발현하는 Tg-처리 세포에서 65.2%로 유의하게 높았다. 이러한 결과는 SP1이 소포체 스트레스 유도성 세포사멸 동안 미토콘드리아 막전위의 붕괴를 억제할 수 있음을 나타낸다.

[0079] **(3) 소포체 스트레스 유도 후 SP1에 의한 CHOP 및 GRP78 발현 수준의 조절**

[0080] HeLa/CTRL 및 HeLa/SP1 세포주에서 Tg 처리 전후의 정량적 PCR(qPCR)에 의해 이들 유전자의 발현을 분석하였다.

[0081] 두 세포주의 CHOP의 기초 수준은 Tg에 의해 유도된 소포체 스트레스가 없는 경우 거의 동일했다(도 3A). HeLa/CTRL 세포의 Tg 처리로 CHOP 발현 수준이 47.3 배 증가했다. 그러나, CHOP 발현 수준의 증가는 SP1의 존재에 의해 유의하게 억제되었고, HeLa/SP1은 Tg 처리 후 CHOP 발현 수준의 21.8 배의 증가만을 나타냈다.

[0082] CHOP 단백질 발현 수준은 또한 웨스턴블롯으로 분석하였다(도 3B). CHOP 단백질 발현은 SP1 발현이 없는 경우

Tg 처리시 현저히 증가하였다. 그러나 증가폭은 HeLa/CTRL보다 HeLa/SP1에서 약간 낮았다. 이러한 모든 결과는 SP1이 CHOP 발현의 상류 사건을 억제함으로써 소포체 스트레스에 의해 유발된 세포사멸을 억제할 수 있음을 보여 주며 결과적으로 CHOP 발현을 억제한다.

[0083] GRP78 발현은 소포체 기능 및 항상성을 방해하는 다양한 생리학적 및 환경적 스트레스 조건에 의해 유도될 수 있다. 또한 배양 시스템에서 GRP78을 암호화하는 유전자의 전사 활성화는 소포체 스트레스와 UPR의 개시의 지표로 사용된다.

[0084] 따라서, 소포체 스트레스 유도 후에 소포체 스트레스 표지자이며 CHOP 발현의 상류 효과기인 GRP78 발현에 SP1이 미치는 영향도 분석하였다. 예상대로, HeLa/CTRL 또는 HeLa/SP1 세포주에서 소포체 스트레스가 없는 경우 GRP78 mRNA 및 단백질 발현 수준에는 유의한 차이가 없었다(도 3C, D). HeLa/SP1 세포에서 GRP78 발현이 3.3배 증가한 반면, Tg 처리 후, GRP78 mRNA 수준은 HeLa/CTRL 세포에서는 급격히 증가하였다(8.4 배). GRP78 단백질 수준의 증가도 HeLa/CTRL과 비교하여 HeLa/SP1에서는 억제되었다.

[0085] 이러한 결과는 SP1이 소포체 스트레스 유도 후 GRP78 발현 수준을 감소시킴으로써 CHOP 발현의 증가를 억제한다는 가설을 뒷받침하며, 이후에 세포사멸을 억제한다. 이 결과에서, SP1은 상류 사건, 즉 GRP78 발현을 조절함으로써 소포체 스트레스에 의해 유도된 세포사멸로부터 세포를 보호한다는 것이 분명하다.

[0086]

[0087] **(4) SP1이 세포내 $Ca^{2+}$ 수준에 미치는 영향**

[0088] 소포체가 $Ca^{2+}$ 항상성에 관여하기 때문에 소포체 스트레스에 세포를 노출시키면 $Ca^{2+}$ 항상성이 변경된다. Tg 처리는 소포체 저장 $Ca^{2+}$의 세포질로의 방출을 유도하여 세포의 $Ca^{2+}$ 균형에 영향을 주어 단백질 응집을 촉발한다. 세포에서의 SP1 발현이 GRP78 발현의 증가를 포함하여 소포체 스트레스에 대한 상류 세포 반응을 억제하기 때문에, SP1이 또한 소포체 $Ca^{2+}$ 수준을 조절하고 소포체에서 $Ca^{2+}$의 세포질로의 누출을 차단 하는지 확인하기를 원했다. 소포체에서 $Ca^{2+}$의 누출이 소포체 스트레스-유도 세포사멸 경로 초기 사건이기 때문에, 세포질의 $Ca^{2+}$ 수준은 위의 다른 사건에 비해 초기 시점에서 평가되었다.

[0089] 1시간 동안 Tg로 처리된 세포에 Fluo-3, AM을 로딩하여 세포질 $Ca^{2+}$ 수준을 평가하였다. 도 4에 나타난 바와 같이, HeLa/CTRL 세포에서 세포질 $Ca^{2+}$ 수준이 현저히 증가하여 소포체에서의 $Ca^{2+}$ 누출을 나타냈다. 반대로, Tg에 노출된 후에도 HeLa/SP1 세포에서는 세포질 $Ca^{2+}$ 수준이 어떠한 증가도 보이지 않았다.

[0090] 이 결과는 SP1이 소포체 $Ca^{2+}$ 수준을 유지하고 세포에서 $Ca^{2+}$ 항상성을 유지하는데 도움을 줌으로써 세포가 소포체 스트레스 유발성 세포사멸로 진행되는 것을 막는다는 것을 입증한다.

[0091] SP1이 오직 Tg 처리로 인한 소포체 스트레스 유발된 세포사멸만을 억제할 가능성을 배제하기 위해, 다른 유형의 소포체 스트레스 유도제로 세포를 처리하여 SP1의 항-세포사멸 효과를 조사하였다. 세포 생존력은 DTT 2 mM 또는 브레펠딘A(Brefeldin A) 2 μM 처리 전후에 trypan blue exclusion assay를 사용하여 측정하였다. DTT는 디설파이드(disulfide) 결합 형성을 차단하며, 이는 소포체 스트레스를 유발한다. Brefeldin A는 소포체에서 골지체로의 단백질 운반을 억제함으로써 소포체에서 미접힘 단백질의 축적을 유도한다.

[0092] 도 5A에 나타난 바와 같이, DTT로 처리하면 처리 후 36시간에서 HeLa/CTRL에서 세포 생존력을 60.9%까지 대폭 감소시켰다. 반대로 HeLa/SP1 치료 후 세포 생존율은 치료 후 36시간에서 81.4%만 감소했다. Brefeldin A가 소포체 스트레스 유도제로 사용되었을 때 SP1의 유사한 항-세포사멸 효과가 관찰되었다(도 5B).

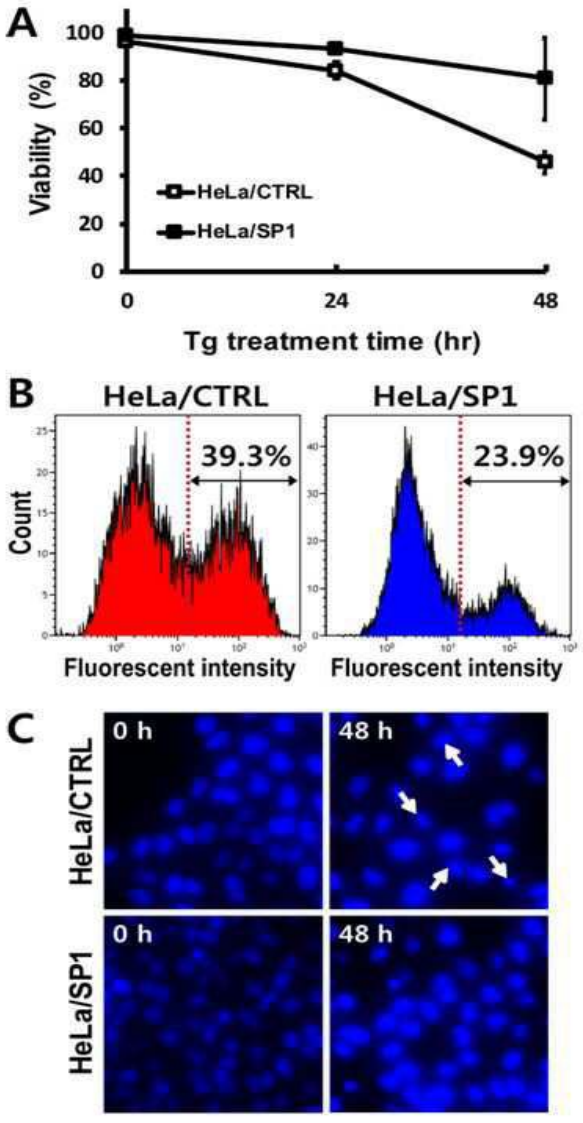
[0093] 이러한 결과는 SP1의 효과가 한 종류의 소포체 스트레스 유도제에 국한되지 않고 소포체 스트레스 유발성 세포사멸의 일반적인 억제제로 인정될 수 있음을 나타낸다.

[0094] GRP78 전위 및 발현 모두 소포체 스트레스를 겪고 있는 세포에서 결정적인 사건이다. 스트레스가 없을 때, GRP78은 IRE1α, PERK 및 ATF6에 결합한다. Tg 처리시, GRP78의 전위 및 소포체에서의 미접힘 단백질의 축적은 UPR을 활성화시킨다. GRP78 전위는 축적된 단백질에 분자 보호자 역할을 해야 하며, GRP78 전위 후의 ATF6 활성화는 GRP78 단백질 발현 수준을 증가시켜 단백질 접힘 용량을 상향 조절한다. 따라서, GRP78 전위와 발현 모두 소포체 스트레스-매개 세포 사건에서 밀접하게 관련된 사건이다.

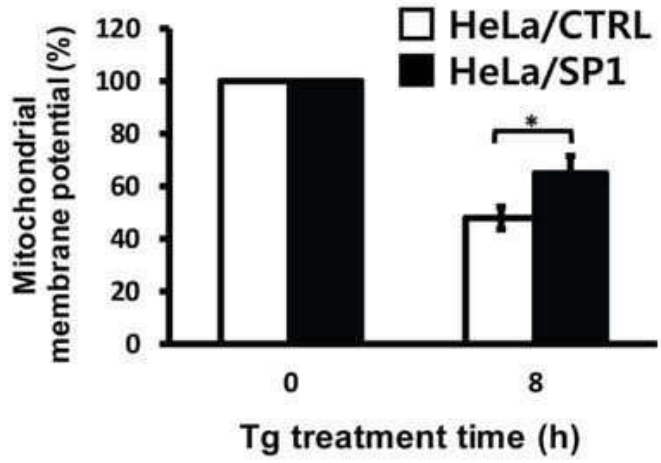
[0095] 이 결과에서, SP1은 Tg 처리 후 소포체에서 $Ca^{2+}$ 누출을 억제하고 GRP78 mRNA 및 단백질 발현 수준을 억제했다. 본 발명자는 SP1에 의한 $Ca^{2+}$ 누출의 억제가 이후에 소포체막으로부터 GRP78 전위를 억제한다고 가정하였다. Tg 처리 후 $Ca^{2+}$ 누출이 GRP78 발현을 증가시키는 것으로 알려져 있기 때문에, $Ca^{2+}$ 누출의 억제는 전위된 GRP78 단백질 수준을 감소시킬 수 있으며, 이는 간접적으로 CHOP 발현을 억제한다. $Ca^{2+}$ 누출 및 GRP78 전위에 대한 SP1 효과의 정확한 메커니즘을 조사하기 위해 앞으로 더 많은 연구가 있어야 한다.

## 도면

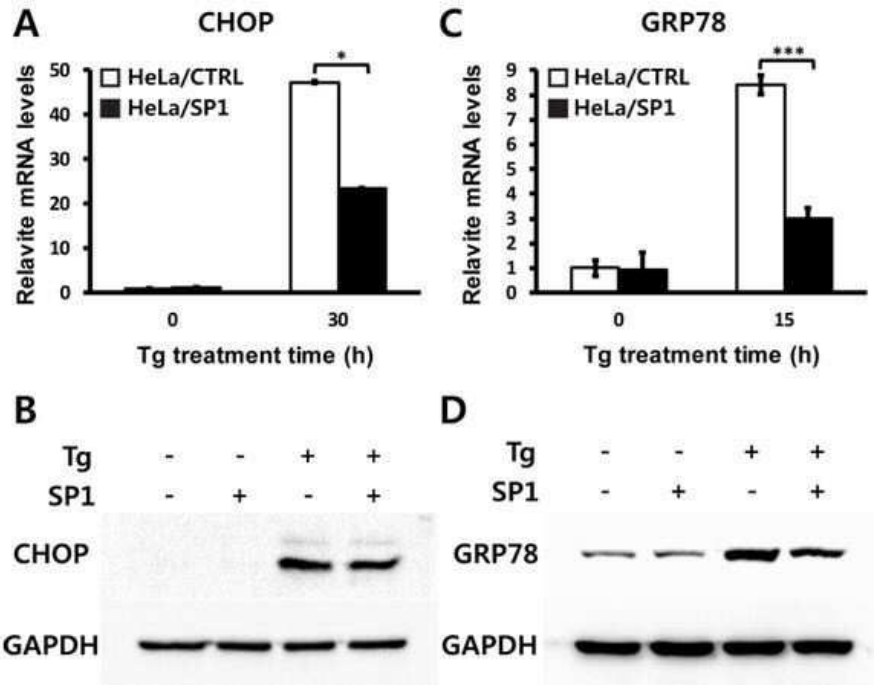
### 도면1



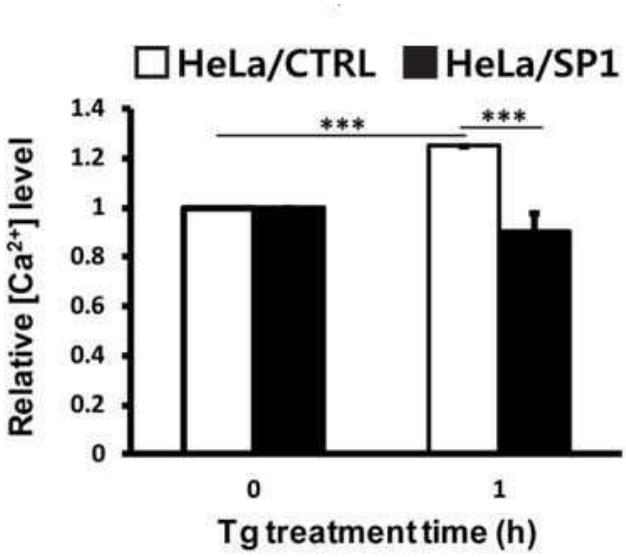
도면2


HeLa/CTRL
HeLa/SP1
Mitochondrial membrane potential (%)
120
100
80
60
40
20
0
*
0
8
Tg treatment time (h)

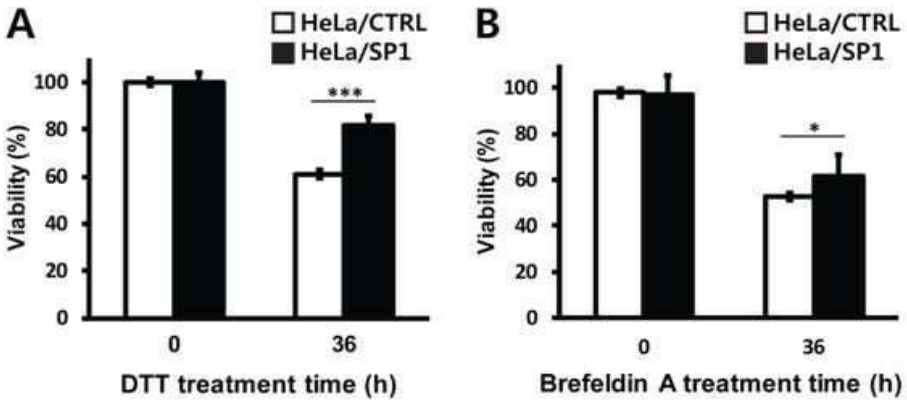
도면3


A
CHOP
Relavite mRNA levels
HeLa/CTRL
HeLa/SP1
*
0
30
Tg treatment time (h)
C
GRP78
Relavite mRNA levels
HeLa/CTRL
HeLa/SP1
***
0
15
Tg treatment time (h)
B
Tg - - + +
SP1 - + - +
CHOP
GAPDH
D
Tg - - + +
SP1 - + - +
GRP78
GAPDH

도면4




도면5




서 열 목 록

<110> INCHEON UNIVERSITY INDUSTRY ACADEMIC COOPERATION FOUNDATION

<120> PHARMACEUTICAL COMPOSITION COMPRISING SILKWORM STORAGE PROTEIN 1 FOR PREVENTING OR TREATING ENDOPLASMIC RETICULUM STRESS-RELATED DISEASES

<130> P18-0050

<160> 2

<170> KoPatentIn 3.0

<210> 1

<211> 2323

<212> DNA

<213> Bombyx mori

<400> 1

ggctcaggag ttcttcaaac atgagggttc tagtactact ggcctgcttg gccgcggcgt 60

cagctacagc gattagtggt ggctacggga cgatggtctt caccaaggaa ccaatggtaa 120

accttgacat gaagatgaag gagctttgca tcatgaagct gcttgaccat atcctccagc 180

cgaccatgtt tgaggacatc aaggagatcg ccaaggagta taacatcgag aaaagttgcg 240

acaagtacat gaatgtcgat gtcgttaagc agttcatgga gatgtataag atgggcatgc 300

tcccgcgtgg agagaccttc gtccacacca acgagctcca aatggaagaa gccgtcaaag 360

tcttccgagt cctctactac gctaaggact tcgatgtttt catgaggact gcgtgctgga 420

tgagagaaag gatcaacgga ggcatgttcg tctacgcttt tactgccgcg tgcttccaca 480

gaaccgactg caagggtctc tacctgcccg ctccttacga gatctatccc tacttcttcg 540

ttgacagcca tgtcatcagt aaagccttta tgatgaagat gactaaagcc gccaaggacc 600

cggtcctctg gaaatactac ggcatcacgg ttactgacga caatttggta gtgattgact 660

ggcgtaaggg agtccgccgc tctttatccc aaaacgatgt tatgtcctat ttcatggagg 720

acgtcgacct taacacctac atgtactacc tccacatgaa ctatccgttc tggatgaccg 780

acgacgcata cggcataaac aaggagcgtc gtggcgagat catgatgtac gccaaccagc 840

aactcctagc tagaatgaga ctggaacgtc tgagccacaa gatgtgtgac gttaagccta 900

tgatgtggaa cgagccccta gagaccggtt actggcctaa aatccgtctt cccagcggtg 960

atgaaatgcc cgtccgccag aacaacatgg tcgttgccac gaaagataac ctcaagatga 1020

agcagatgat ggatgatgtt gaaatgatga tccgagaggg tatccttact ggaaagatcg 1080

agcgtcgtga cggcactgtt ataagcctga agaagtctga ggacattgaa aacctcgccc 1140

gtctggtcct cggtggccta gaaattgttg gcgacgatgc taaagttatc cacttgacca 1200

acttgatgaa gaaaatgctg agctatggcc aatacaacat ggacaagtac acctacgtgc 1260

cgacttcctt ggacatgtac actacctgtc tccgcgatcc tgtcttctgg atgatcatga 1320

aacgagtttg caacatcttc accgttttca agaacatgct cccgaaatat actcgcgaac 1380

agttcagctt ccccggagtc aaagtggaga aaattaccac cgatgagctg gtcacattcg 1440

ttgatgagta cgacatggac attagcaacg ctatgtacct ggacgcaact gagatgcaga 1500

acaagacatc cgatatgacc tttatggccc gcatgcgccg cctcaatcac catccgttcc 1560

aggtgtcgat tgatgtcatg tccgacaaaa ctgtcgatgc tgtggtccgc atcttcctgg 1620

gtcccaagta cgactgcatg ggcaggctca tgagcgtcaa cgacaaacgc ctcgacatgt 1680

tcgagctgga cagctttatg tacaaactgg tcaacggaaa gaacaccatc gtccgtagct 1740

ccatggatat gcaaggattt atcccagagt acctttcgac tcgtcgtgta atggaaagcg 1800

aaatgatgcc ttccggagat ggccagacaa tggtcaagga ctggtggtgc aagtctcgca 1860
acggattccc tcagagactt atgctgcccc tcggtacgat tggaggtttg gagatgcaga 1920
tgtacgtcat cgtgtcgccg gtccgcaccg gtatgctctt gcccacattg gacatgacca 1980
tgatgaagga ccgttgtgct tgtcgctgga gctcatgtat ctccaccatg cctctcggat 2040
atccatttga cagaccgatt gacatggcga gcttcttcac tagcaacatg aagttcgctg 2100
acgtaatgat ctacagaaaa gacctcggca tgtcgaacac cagcaagacc gtggacacct 2160
cggagatggt catgatgaag gacgatctca cctacctgga ctcggacatg ctggtcaaga 2220

ggacttacaa agacgtcatg atgatgagca gcatgatgaa ctgatcacac gacattgtac 2280
ctaacctaaa ccagaaaatt attgaataaa acattcattt gct 2323

<210> 2
<211> 747
<212> PRT
<213> Bombyx mori
<400> 2

Met Arg Val Leu Val Leu Leu Ala Cys Leu Ala Ala Ala Ser Ala Thr
1 5 10 15
Ala Ile Ser Gly Gly Tyr Gly Thr Met Val Phe Thr Lys Glu Pro Met
20 25 30
Val Asn Leu Asp Met Lys Met Lys Glu Leu Cys Ile Met Lys Leu Leu

35 40 45
Asp His Ile Leu Gln Pro Thr Met Phe Glu Asp Ile Lys Glu Ile Ala
50 55 60
Lys Glu Tyr Asn Ile Glu Lys Ser Cys Asp Lys Tyr Met Asn Val Asp
65 70 75 80
Val Val Lys Gln Phe Met Glu Met Tyr Lys Met Gly Met Leu Pro Arg
85 90 95
Gly Glu Thr Phe Val His Thr Asn Glu Leu Gln Met Glu Glu Ala Val
100 105 110

Lys Val Phe Arg Val Leu Tyr Tyr Ala Lys Asp Phe Asp Val Phe Met

115 120 125

Arg Thr Ala Cys Trp Met Arg Glu Arg Ile Asn Gly Gly Met Phe Val
130 135 140
Tyr Ala Phe Thr Ala Ala Cys Phe His Arg Thr Asp Cys Lys Gly Leu
145 150 155 160
Tyr Leu Pro Ala Pro Tyr Glu Ile Tyr Pro Tyr Phe Phe Val Asp Ser
165 170 175
His Val Ile Ser Lys Ala Phe Met Met Lys Met Thr Lys Ala Ala Lys

180 185 190
Asp Pro Val Leu Trp Lys Tyr Tyr Gly Ile Thr Val Thr Asp Asp Asn
195 200 205
Leu Val Val Ile Asp Trp Arg Lys Gly Val Arg Arg Ser Leu Ser Gln
210 215 220
Asn Asp Val Met Ser Tyr Phe Met Glu Asp Val Asp Leu Asn Thr Tyr
225 230 235 240
Met Tyr Tyr Leu His Met Asn Tyr Pro Phe Trp Met Thr Asp Asp Ala
245 250 255

Tyr Gly Ile Asn Lys Glu Arg Arg Gly Glu Ile Met Met Tyr Ala Asn
260 265 270
Gln Gln Leu Leu Ala Arg Met Arg Leu Glu Arg Leu Ser His Lys Met
275 280 285
Cys Asp Val Lys Pro Met Met Trp Asn Glu Pro Leu Glu Thr Gly Tyr
290 295 300
Trp Pro Lys Ile Arg Leu Pro Ser Gly Asp Glu Met Pro Val Arg Gln
305 310 315 320
Asn Asn Met Val Val Ala Thr Lys Asp Asn Leu Lys Met Lys Gln Met

325 330 335
Met Asp Asp Val Glu Met Met Ile Arg Glu Gly Ile Leu Thr Gly Lys
340 345 350
Ile Glu Arg Arg Asp Gly Thr Val Ile Ser Leu Lys Lys Ser Glu Asp
355 360 365
Ile Glu Asn Leu Ala Arg Leu Val Leu Gly Gly Leu Glu Ile Val Gly
370 375 380

Asp Asp Ala Lys Val Ile His Leu Thr Asn Leu Met Lys Lys Met Leu
385 390 395 400

Ser Tyr Gly Gln Tyr Asn Met Asp Lys Tyr Thr Tyr Val Pro Thr Ser
405 410 415
Leu Asp Met Tyr Thr Thr Cys Leu Arg Asp Pro Val Phe Trp Met Ile
420 425 430
Met Lys Arg Val Cys Asn Ile Phe Thr Val Phe Lys Asn Met Leu Pro
435 440 445
Lys Tyr Thr Arg Glu Gln Phe Ser Phe Pro Gly Val Lys Val Glu Lys
450 455 460
Ile Thr Thr Asp Glu Leu Val Thr Phe Val Asp Glu Tyr Asp Met Asp

465 470 475 480
Ile Ser Asn Ala Met Tyr Leu Asp Ala Thr Glu Met Gln Asn Lys Thr
485 490 495
Ser Asp Met Thr Phe Met Ala Arg Met Arg Arg Leu Asn His His Pro
500 505 510
Phe Gln Val Ser Ile Asp Val Met Ser Asp Lys Thr Val Asp Ala Val
515 520 525
Val Arg Ile Phe Leu Gly Pro Lys Tyr Asp Cys Met Gly Arg Leu Met
530 535 540

Ser Val Asn Asp Lys Arg Leu Asp Met Phe Glu Leu Asp Ser Phe Met
545 550 555 560
Tyr Lys Leu Val Asn Gly Lys Asn Thr Ile Val Arg Ser Ser Met Asp
565 570 575
Met Gln Gly Phe Ile Pro Glu Tyr Leu Ser Thr Arg Arg Val Met Glu
580 585 590
Ser Glu Met Met Pro Ser Gly Asp Gly Gln Thr Met Val Lys Asp Trp
595 600 605
Trp Cys Lys Ser Arg Asn Gly Phe Pro Gln Arg Leu Met Leu Pro Leu

610 615 620
Gly Thr Ile Gly Gly Leu Glu Met Gln Met Tyr Val Ile Val Ser Pro

625 630 635 640

Val Arg Thr Gly Met Leu Leu Pro Thr Leu Asp Met Thr Met Met Lys

645 650 655

Asp Arg Cys Ala Cys Arg Trp Ser Ser Cys Ile Ser Thr Met Pro Leu

660 665 670

Gly Tyr Pro Phe Asp Arg Pro Ile Asp Met Ala Ser Phe Phe Thr Ser

675 680 685

Asn Met Lys Phe Ala Asp Val Met Ile Tyr Arg Lys Asp Leu Gly Met

690 695 700

Ser Asn Thr Ser Lys Thr Val Asp Thr Ser Glu Met Val Met Met Lys

705 710 715 720

Asp Asp Leu Thr Tyr Leu Asp Ser Asp Met Leu Val Lys Arg Thr Tyr

725 730 735

Lys Asp Val Met Met Met Ser Ser Met Met Asn

740 745